

Detección de microorganismos patógenos en los alimentos

Prof. Dr. Luis M. Medina

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS EN ALIMENTOS

Indicadores

recuento total (BAM...)

enterobacteriáceas totales

coliformes totales

E. coli

mohos y levaduras...

Patógenos

Salmonella

Campylobacter

E. coli O157:H7

Listeria

Toxina estafilocócica

¿Otros *E. coli* ?

Cronobacter

Protozoos y virus...

2008

Aproximadamente 1500 millones de ensayos microbiológicos

58% corresponde a la industria alimentaria

49% alimentos

9% bebidas



20% detección de patógenos *Salmonella* y *E. coli* O157:H7

80% análisis rutinarios (recuento total, coliformes, mohos y levaduras...)

2008

Aproximadamente 1500 millones de ensayos microbiológicos

58% corresponde a la industria alimentaria

49% alimentos

9% bebidas



30% América del Norte

30% Europa

30% Resto del mundo (creciendo)



MÉTODOS CONVENCIONALES

Ventajas

sensibilidad

la facilidad de interpretación

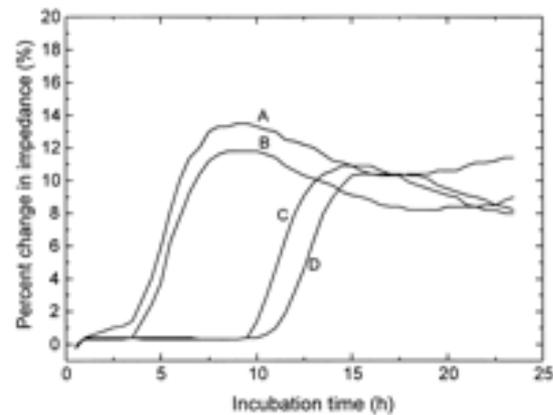
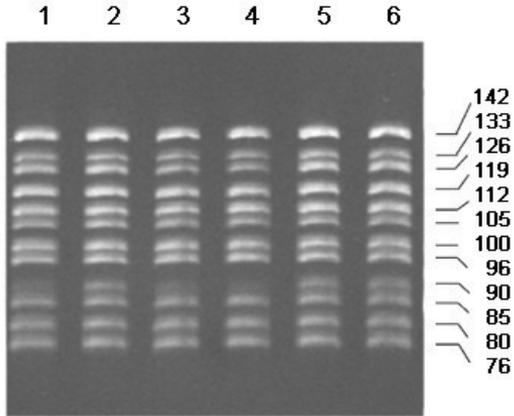
bajo costo

Inconvenientes

demora en la obtención de datos

grandes cantidades de medios de cultivo

laboriosidad



EXPECTATIVAS DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS

Ventajas

rapidez

procesar elevado número de muestras / tiempo

en general, facilidad de uso

límites de detección bajos

precisión (sensibilidad y especificidad)

Inconvenientes inversión inicial (equipamientos)

en general, no excluye la etapa de enriquecimiento
a veces, necesidad de confirmación

a veces, difícil traducción cuantitativa de resultados

Factores de elección de una técnica

Precisión necesaria

Nivel de resolución

Facilidad de uso

Tiempo de obtención de resultados

Aceptabilidad / Validación

Coste analítico

Amortización de la inversión

Disponibilidad de espacios (en ocasiones)

Soporte y mantenimiento técnico

Versatilidad / Evolución

Factores necesariamente exigibles

Fiable

Significativa

Económicamente aceptable

Clasificación según tiempo empleado

Métodos rápidos

Métodos muy rápidos

Automatización de métodos convencionales

Clasificación según tiempo empleado

Métodos rápidos

Permiten obtener resultados en 6-12 horas

Actúan amplificando los efectos del crecimiento activo de los microorganismos

Clasificación según tiempo empleado

Métodos muy rápidos

Permiten obtener resultados incluso en menos de una hora

Clasificación según tiempo empleado

Automatización de métodos convencionales

Reducir el gasto de material

Aumentan el número de muestras a analizar

Sin embargo no disminuye el tiempo necesario para completar cada ensayo

El principal factor de elección será el número habitual de muestras a procesar

Las técnicas de análisis microbiológico de alimentos se basarán en

Técnicas de enumeración directa y de recuento de células viables

Técnicas de medición de biomasa

Sistemas miniaturizados y kits de diagnóstico

Métodos inmunológicos

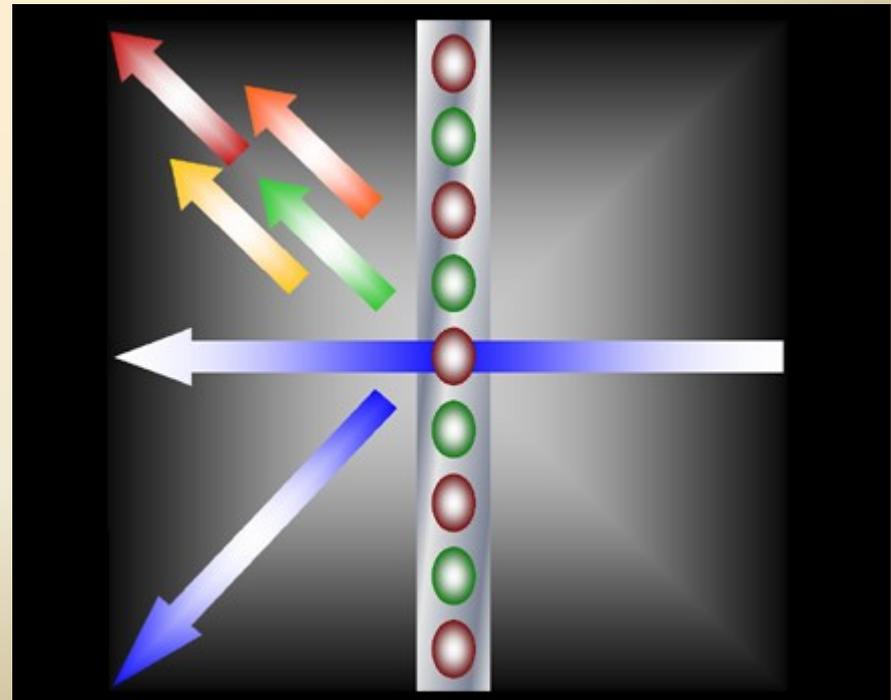
Métodos genéticos

Automatización de procesos y rutinas laboratoriales

Métodos de enumeración directa

CITOMETRIA DE FLUJO

- Marcador Fluorassure (sustrato enzimático no fluorescente) ↖ fluorescencia del citoplasma celular de células viables
- Citómetro de flujo ↖ capta la fluorescencia



Métodos de enumeración directa

TURBIDIMETRIA

Las células refractan la luz incidente

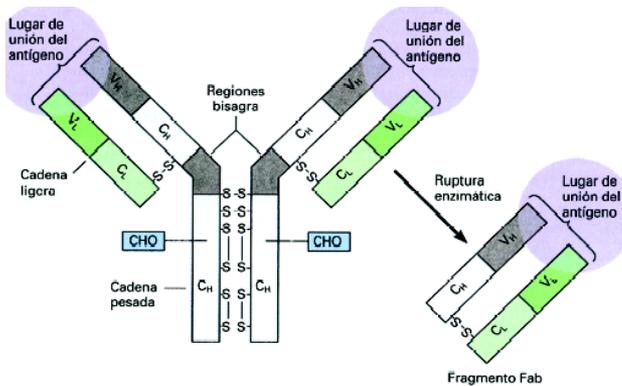


Métodos de enumeración directa

EPIFLUORESCENCIA (DEFT) microscopio de epifluorescencia

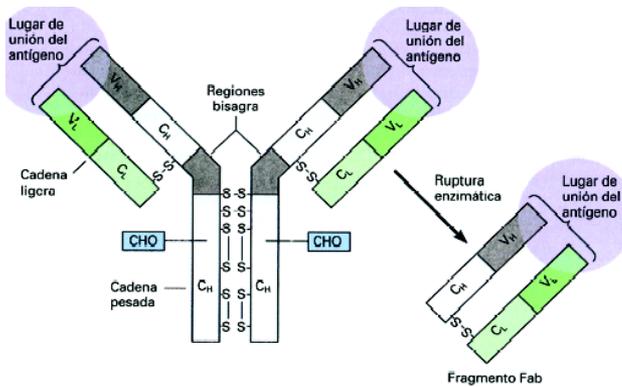
- No necesario tiempo de incubación
- Filtrado de muestra (concentración bacteriana)
- Tinción con FLUOROCROMO ↩ Microscopio Epifluorescencia
- Recuento directo de las bacterias
- Alta exactitud
- Leche (glóbulos de grasa/Tripsina)





Métodos inmunológicos

- Visualización de la interacción entre un Ag y su correspondiente Ac
- No enriquecimiento previo de microorganismos
- ELISA (ELISA SANDWICH): Ac inmovilizado sobre matriz solida captura al Ag ↩ Un 2º Ac marcado con una enzima reconoce un epítipo del Ac captura ↩ color al reaccionar 2ª Ac con el complejo Ag-Ac (ELISA DIRECTO)
- Alta sensibilidad, rapidez y bajo coste por análisis
- Disminuyen el tiempo de análisis ↩ Minutos a horas ↩ Número elevado de muestras
- Poco instrumental necesario



Métodos inmunológicos

- Automatización de ELISA para:

Salmonella

E. coli O157:H7

Listeria monocytogenes

Campylobacter spp.

Toxina estafilocócica



Tecnología ELFA

Enzyme-Linked Fluorescent Assay

Métodos inmunológicos

Método muy rápido

TECNOLOGÍA ELFA

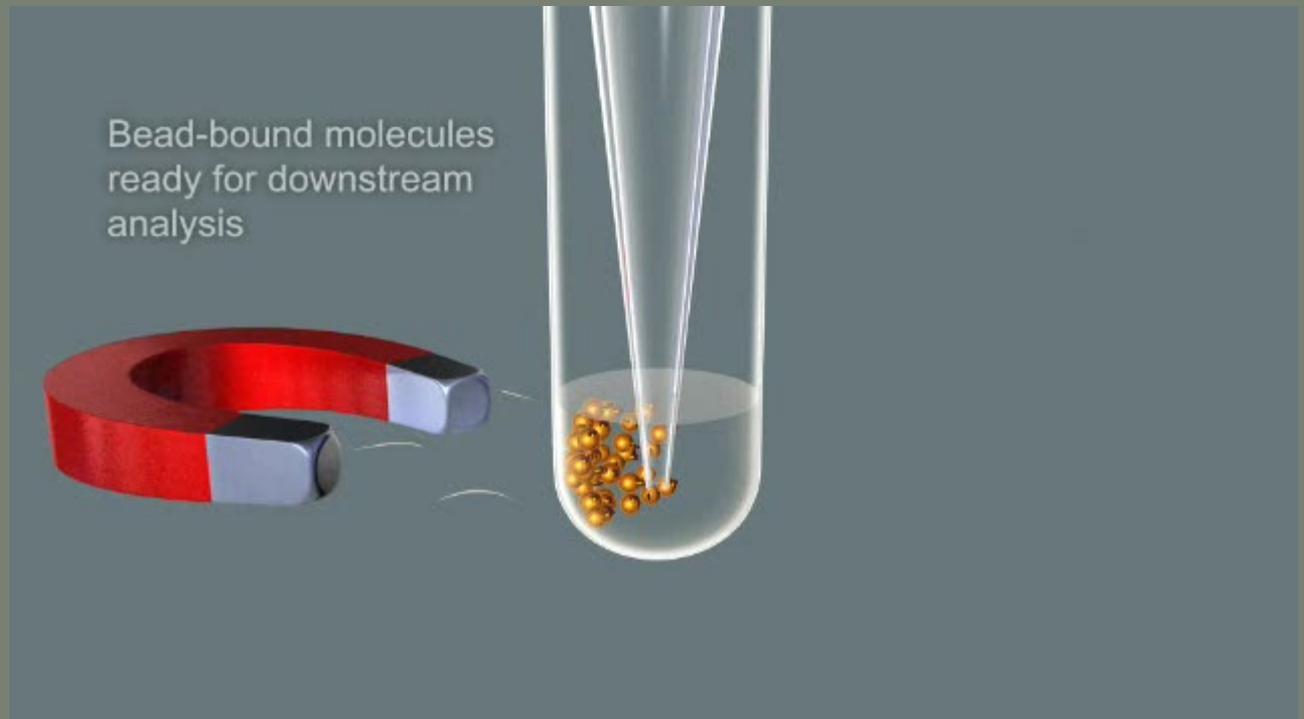
Enzyme-Linked Fluorescent Assay

Sistema VIDAS



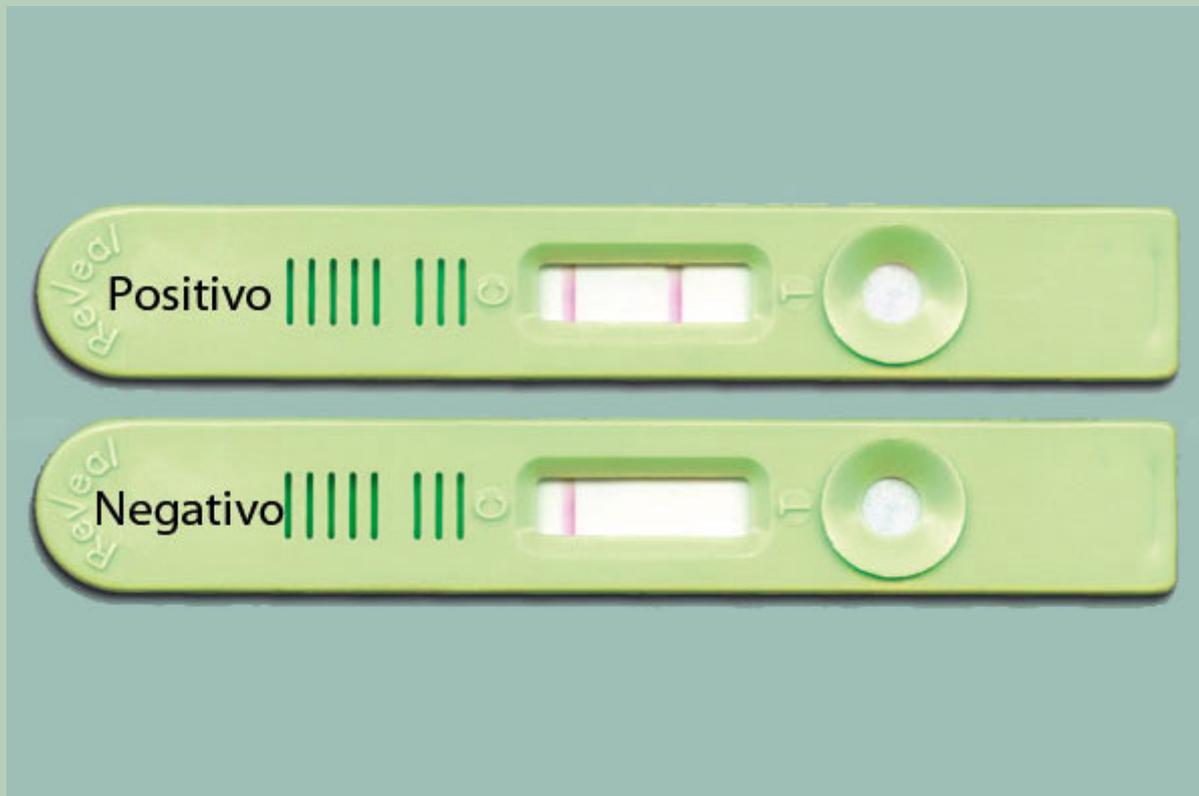
Métodos inmunológicos

A veces, separación inmunomagnética (SIM)
previa a ELISA



Métodos inmunológicos

Kits que combinan inmunoensayo



TEST RAPIDO LISTERIA

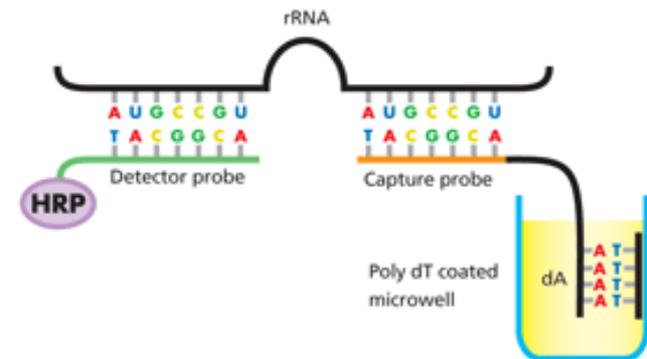
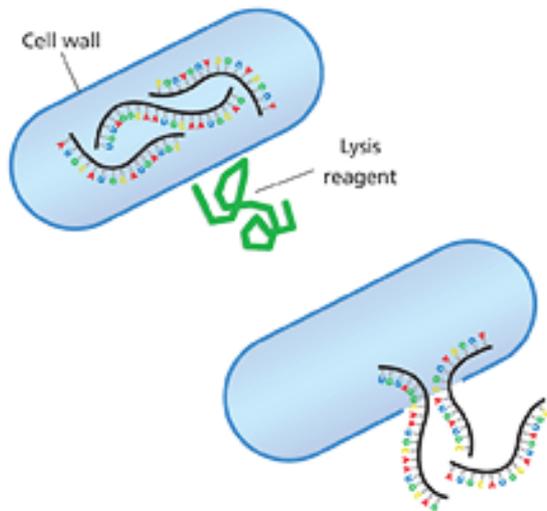


- Extracción del Ag flagelar de listeria
- Línea inmobilizada de Ac ↖ línea azul



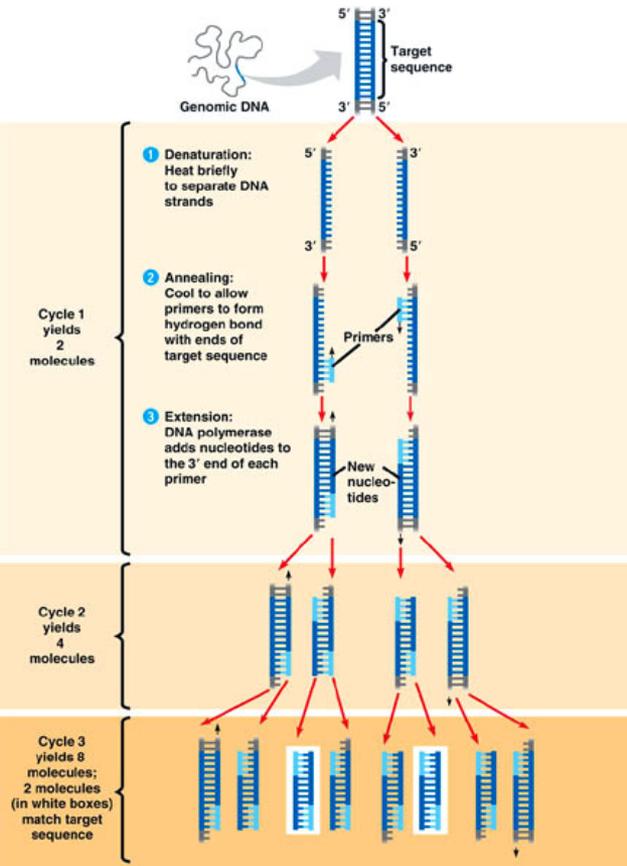
Métodos genéticos

- Se dirigen a la detección de características celulares mucho más estables contenida en los ácidos nucleicos
- **Hibridación** (existen técnicas de hibridación con ARN ribosómico)



Métodos genéticos

- Se dirigen a la detección de características celulares mucho más estables contenida en los ácidos nucleicos



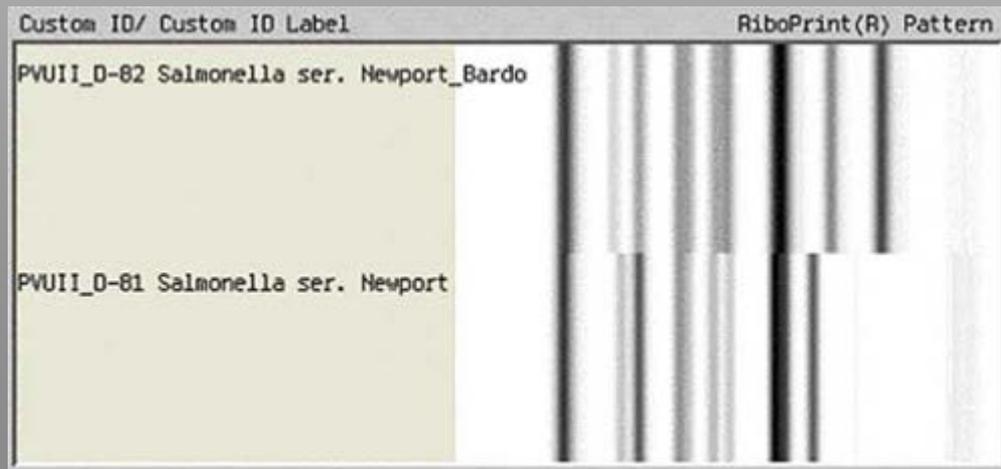
- PCR (amplificando el ADN de los microorganismos diana)

- Se han desarrollado técnicas alternativas para detectar los productos de amplificación

RIBOTIPADO

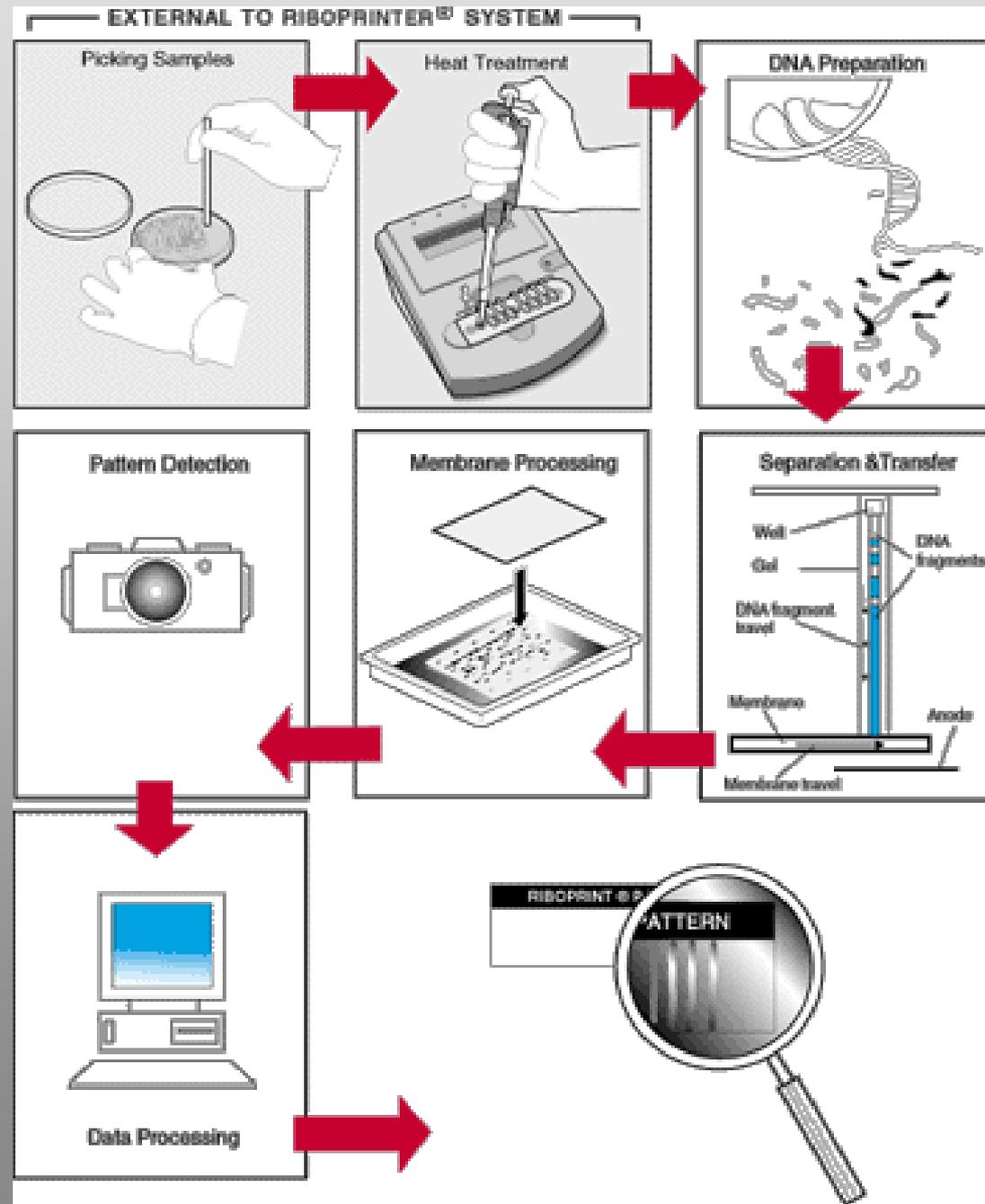
El Ribotipado es un método que permite identificar y clasificar bacterias en función de los genes del RNA ribosomal.

Los genes del rRNA se encuentran dentro de las regiones mejor conservadas del genoma bacteriano. Existen varias copias de genes para el rRNA en cada célula y su número y localización específica en el cromosoma varían según las especies.

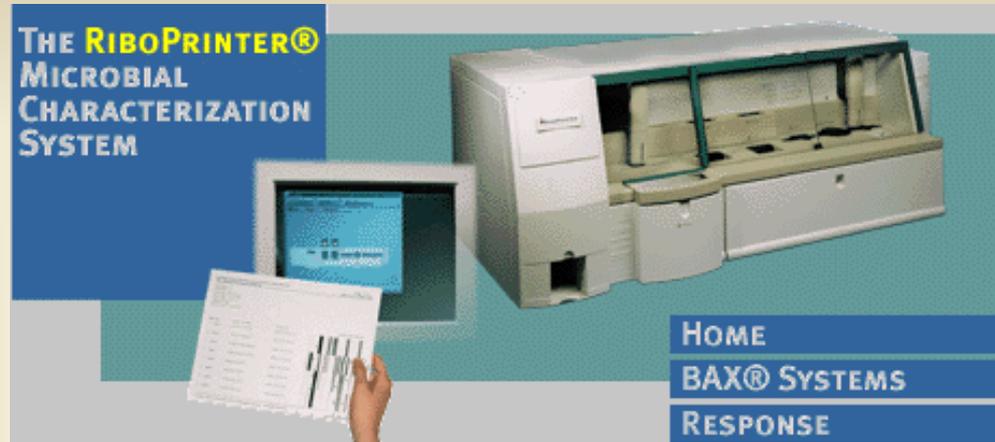


RIBOTIPADO RIBOPRINTER

El sistema determina la huella genética de un microorganismo y la compara con los marcadores genéticos almacenados de los diferentes microorganismos de interés



RIBOTIPADO



- Suministra marcadores genéticos de multitud de bacterias de una manera automática, de esta forma caracteriza genéticamente microorganismos.
- Herramienta ideal para transferir rápidamente información microbiana de determinadas fuente de contaminación
- Suministra una identificación taxonómica de bacterias patógenas de gran interés
- Caracteriza e identifica rápidamente la contaminación microbiológica
- Incluso puede utilizarse para caracterizar los cultivos iniciadores u otros microorganismos beneficiosos

PCR MÚLTIPLE

ADIAFOOD[®] kits PCR

- Un solo protocolo de amplificación de PCR para todos los patógenos aplicables
- Análisis simultáneo de dichos patógenos
- Resultados en menos de 24 horas (11-21 horas)
- *Listeria* sp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli* O157, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter* y *Staphylococcus aureus*
- Poca manipulación: el termociclador controla la extracción de ADN y la amplificación PCR y el análisis de los resultados
- Enriquecimiento: 18 horas. Extracción: <30 minutos. Detección: 2 horas



SISTEMA BAX QUALICON

Sistema BAX® basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Ventajas:

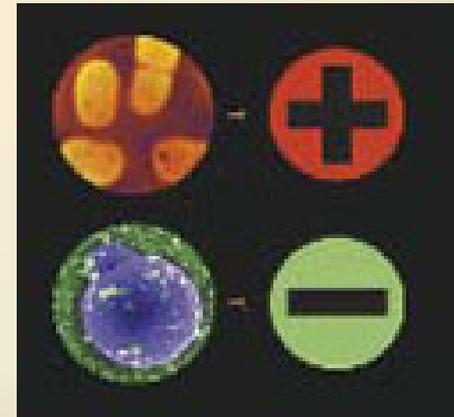
- Plazo de obtención de resultados muy reducido
- Posibilidad de estandarización de análisis
- Secuencias genéticas altamente conservadas (elevada especificidad)
- Flexibilidad para el desarrollo de nuevos métodos
- Límites de detección/cuantificación bajo
- Detección de microorganismos viables no cultivables
- Incluyen control positivo interno que permite evaluar presencia de inhibidores de la reacción en las muestras

Existen Métodos Oficiales que incluyen la técnica del Sistema BAX® de *Listeria monocytogenes* y de *Salmonella*. Estas técnicas figuran respectivamente en los documentos USDA-FSIS nº MLG 8A.03 y USDA-FSIS nº MLG 4C.02.

SISTEMA BAX QUALICON

Tecnología PCR múltiple

- rapidez: preparación de muestras más 4 horas
- sensibilidad: principales patógenos
- flexibilidad de uso (refrigerar muestras...)
- facilidad de uso: 96 muestras a la vez – 200/día



SISTEMA BAX

para detección de *Listeria*

Primer ensayo de PCR de transcriptasa inversa aplicado a Microbiología de los Alimentos

- rapidez: 8 horas
- sensibilidad: todas las especies de *Listeria*
- flexibilidad de uso (refrigerar muestras...)
- facilidad de uso: menor manipulación



Método muy rápido

BIOLUMINISCENCIA





- Recuento sobre membranas de filtración
- Membranas incubadas ↩ se libera el ATP y actúa complejo luciferina / luciferasa



Ventajas

Rapidez en obtención de los resultados: hasta en 11 segundos

Fácil manejo: equipos portátiles

Técnica sencilla

Resultados estimulantes

Posibilidad de medidas correctoras

Elevada Sensibilidad: Detección de muy bajos niveles de ATP

Desventajas

Fungible de costo elevado

Resultados no extrapolables a ufc/g o ml

No especifica tipo de microorganismo

Interferencias por ATP no microbiano

Interferencias por detergentes y desinfectantes

Medición de actividad metabólica

REDUCCIÓN DE COLORANTES: modificación del color

MICROCALORIMETRIA: cantidad de calor debida al catabolismo microbiano

RADIOMETRIA: CO₂ en el metabolismo

IMPEDANCIA: Resistencia al flujo de una corriente eléctrica (BACTOMETER y MALTHUS)

- Metabolismo microbiano ↖ Altera la composición química de los medios de cultivo ↖ Variación en la impedancia del medio

- Reduce de 2 a 15 veces el tiempo de análisis

IDENTIFICACIÓN RAPIDA AUTOMATIZADA

Método rápido

MEDICION DE LA IMPEDANCIA



IDENTIFICACION RAPIDA AUTOMATIZADA

SISTEMA API



VITEK ANALYZER

IDENTIFICACION RAPIDA AUTOMATIZADA



Compuesto por:

- Módulos de cultivo que facilitan la inoculación en pocos minutos
- Sustratos bioquímicos y alto rango de identificación y susceptibilidad
- Un incubador/lector simultáneo que incuba y lee los módulos de cultivos inoculados, de alta capacidad. *E. coli* en 2-4 h
- Un ordenador que almacena, procesa e interpreta los resultados

IDENTIFICACION RAPIDA AUTOMATIZADA

BIOLOG

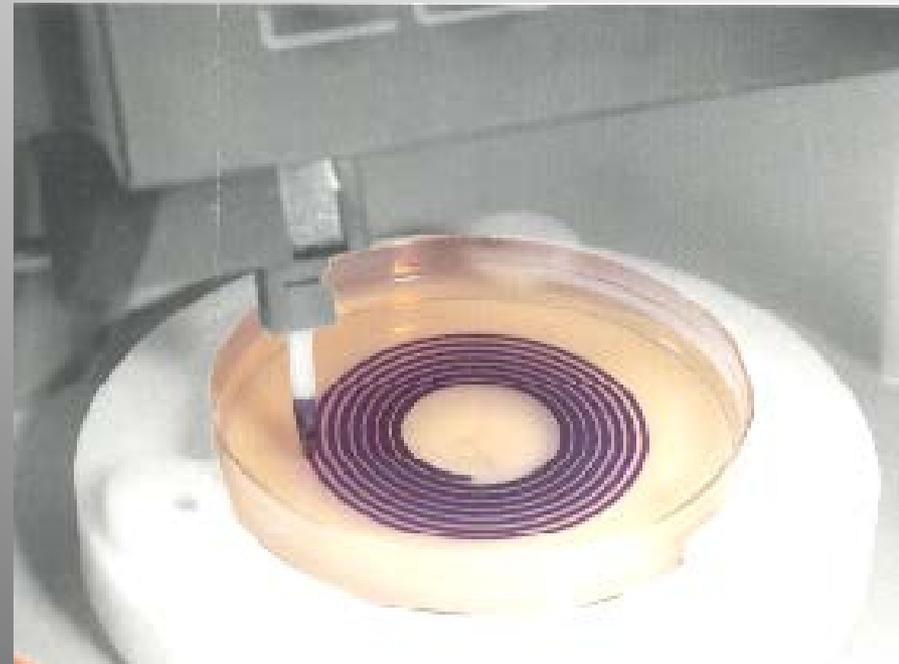
Detecta la capacidad de los microorganismos para usar 95 fuentes de carbono. Los 295 (4x10²⁸) patrones metabólicos posibles permiten, además de la identificación, el establecimiento de relaciones filogenéticas entre distintos aislados



Automatización de métodos

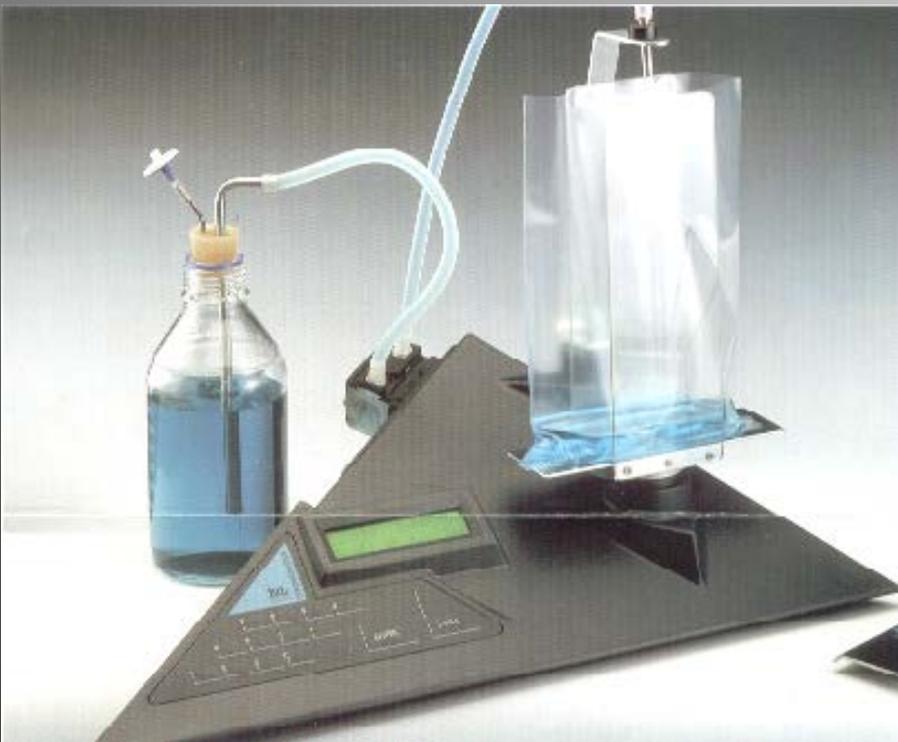
SISTEMA ESPIRAL DE SIEMBRA

- Dispensador: deposita de forma continua un volumen decreciente de muestra en la superficie de una placa de agar
- Intervalo amplio de recuento en una sola placa
- Se eliminan las diluciones seriadas (menos material)
- Siembra automática



Automatización de métodos

DILUIDOR GRAVIMETRICO

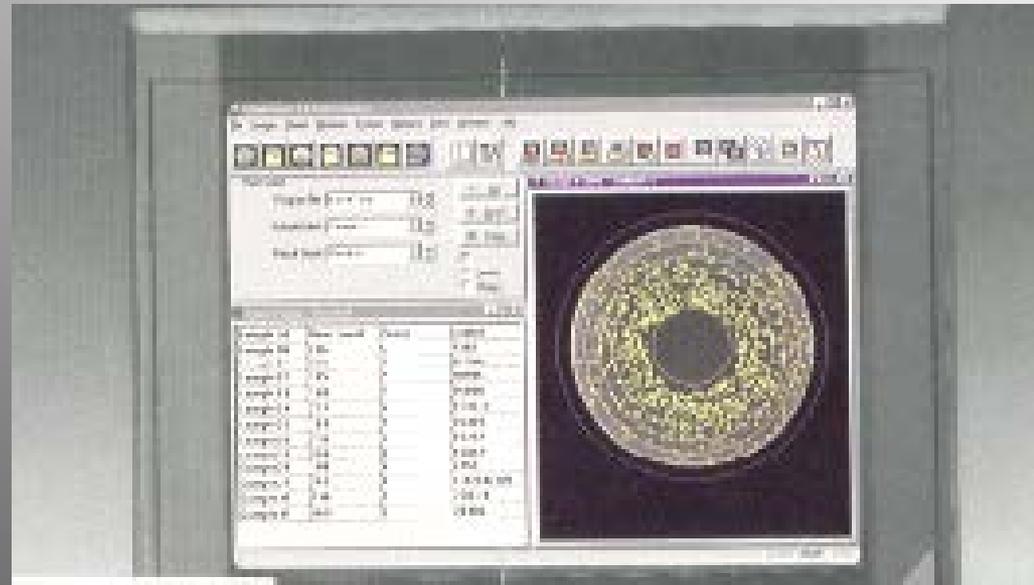


- Se coloca la muestra en la bolsa de Stomacher
- El diluidor añade la cantidad necesaria de diluyente hasta conseguir la dilución deseada
- Aumenta el número de muestras a analizar

Automatización de métodos

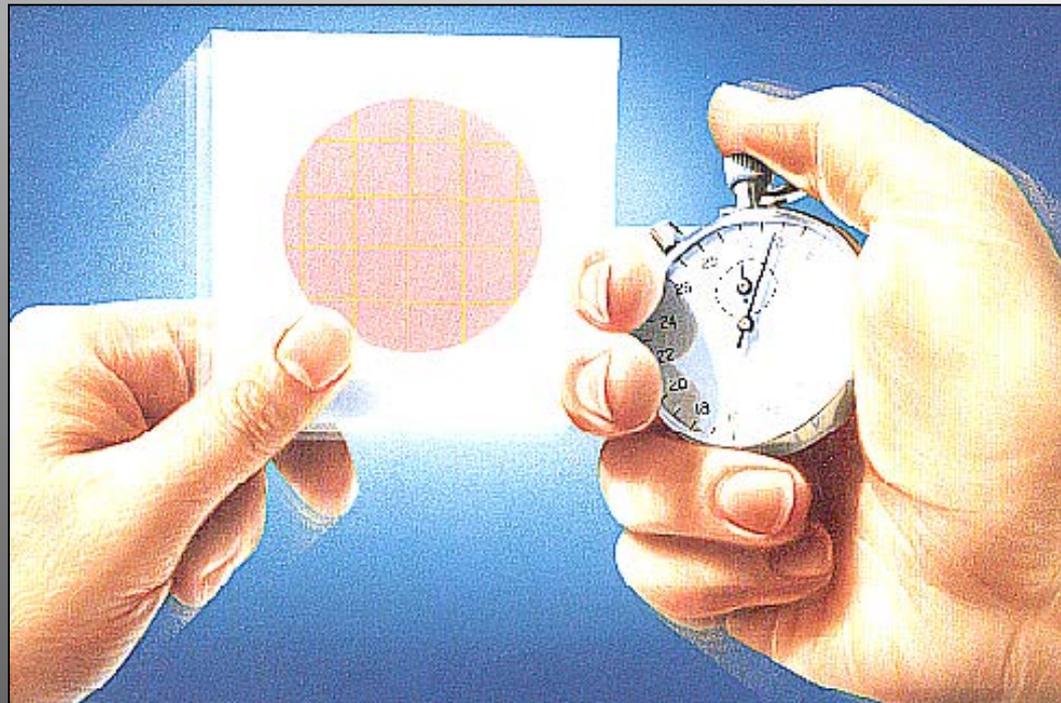
ANALIZADOR DE IMAGEN

- Contador de colonias por análisis de imagen
- Ordenador analiza la población de la placa ↩ características ópticas de las colonias
- Alta reproducibilidad
- Automatización del recuento
- No diferencia entre diferentes tipos de colonias dentro de una misma placa



Automatización de métodos

PETRIFILM



METODO ISOGRID

- Método de filtración
- Malla hidrofóbica colocada en un medio de cultivo e incubada



MEDIOS CROMOGENICOS

Medio selectivo ↩

Coliformes y *Escherichia coli*

2 Sustratos:

- β -glucuronidasa

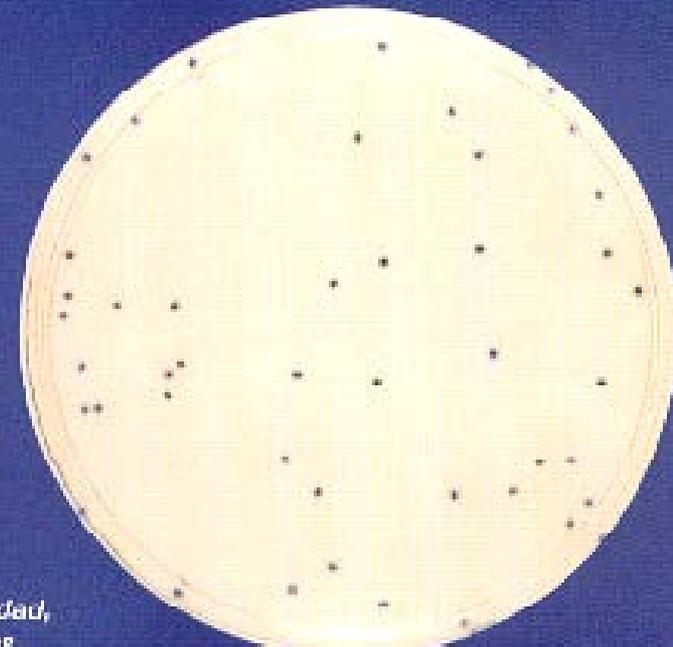
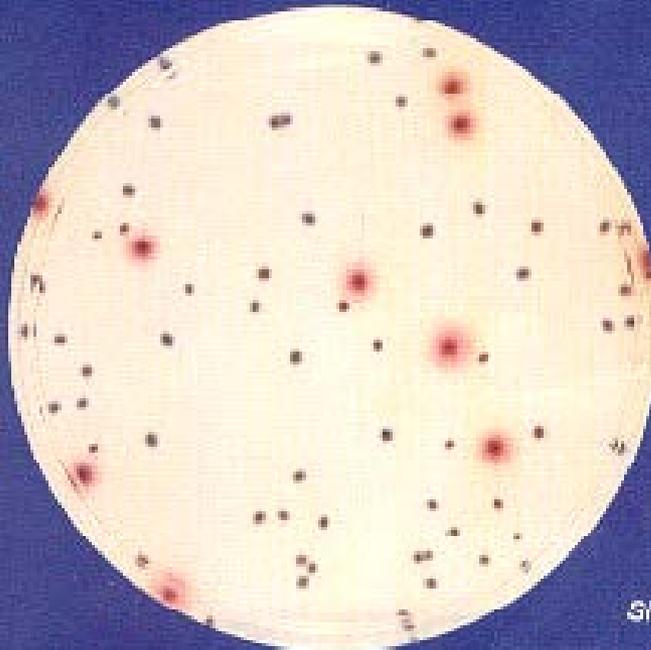
-

+

- β -galactosidasa

-

+



Siembra en profundidad,
lectura en 24 horas

Perspectivas de futuro según Fung (1995) y contrastadas en 2007

El recuento de células viables se mantendrá en 25 años (+)

El control de higiene tendrá lugar “in situ” (+)

La PCR, el ribotipado y los tests genéticos serán una realidad en los laboratorios (+)

Los tests inmunológicos, y ELISA en particular, estarán totalmente automatizados y ampliamente empleados (+)

La tecnología de varillas proveerá respuestas rápidas (+)

Perspectivas de futuro según Fung (1995) y contrastadas en 2007

Se usarán biosensores para los programas APPCC (?)

Biochips, microchips y la nanotecnología avanzará muchísimo en este campo (+)

El aislamiento y concentración efectivas de células objetivo ayudarán a las identificaciones rápidas (+)

Un sistema de alerta microbiológica estará en los alimentos y envases (?)

Los consumidores dispondrán de kits de alerta rápida por patógenos en casa (?)

Perspectivas de futuro

Hoy, la mayoría de ls técnicas rápidas se dirigen a detectar bacterias

Identificación rápida de virus y parásitos implicados en los alimentos

Uso de biosensores y microchips en la industria alimentaria

Envases inteligentes que alerten a los consumidores



Muchas gracias...

Prof. Dr. Luis M. Medina